

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin  
der Philipps-Universität zu Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

**Untersuchungen  
zur Spermafleckendiagnose  
durch papierchromatographischen  
Spermin-Cholin-Nachweis,  
mit Anti-Humansamenplasma-Serum  
und mittels CPK-Nachweises**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Willi Klümpen**  
aus Harteſeld, Krs. Geldern

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin  
der Philipps-Universität zu Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

**Untersuchungen  
zur Spermafleckendiagnose  
durch papierchromatographischen  
Spermin-Cholin-Nachweis,  
mit Anti-Humansamenplasma-Serum  
und mittels CPK-Nachweises**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Willi Klümpen**  
aus Hartefeld, Krs. Geldern

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Marburg am 10.8.1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med.Dr.med.dent.habil.H.HEUSER

Referent: Prof.Dr.med.F.SCHLEYER

Korreferent: Dozent Dr.med.D.PETZOLDT

## Inhalt

|                                                                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. <u>In der Literatur angegebene Methoden zum Sperma-</u><br><u>spurennachweis</u> .....           | 4     |
| B. <u>Die papierchromatographische Nachweismethode</u> .....                                        | 7     |
| 1. Das Verfahren nach LEVONEN .....                                                                 | 7     |
| 2. Eigene Versuche .....                                                                            | 10    |
| a) Vorversuche .....                                                                                | 10    |
| b) Hauptversuche .....                                                                              | 17    |
| 3. Besprechung .....                                                                                | 20    |
| C. <u>Versuche mit präzipitierendem Anti-Humansamen-</u><br><u>plasma-Serum</u> .....               | 21    |
| 1. Literatur .....                                                                                  | 21    |
| 2. Eigene Versuche .....                                                                            | 27 a  |
| 3. Besprechung .....                                                                                | 35    |
| D. <u>Versuche zum Nachweis der Kreatin-Phosphokinase</u><br><u>in Spermafleckenextrakten</u> ..... | 38    |
| 1. Die von GRIFFITHS und LEHMANN beschriebene<br>Nachweismethode für CPK .....                      | 38    |
| 2. Eigene Versuche .....                                                                            | 40    |
| 3. Besprechung .....                                                                                | 48    |
| E. <u>Zusammenfassung</u> .....                                                                     | 50    |
| F. <u>Literatur</u> .....                                                                           | 52    |

A. In der Literatur angegebene Methoden  
zum Spermaspurenachweis

Es gibt viele Methoden des Spermaspurenachweises.  
Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht:

I. Betrachten der Flecken im UV-Licht unter der  
Analysen-Quarzlampe (Fluoreszenznachweis)

II. Morphologische Methoden

1. Mikroskopischer Spermatozoen-Nachweis im  
ungefärbten Präparat oder im Fleckenextrakt
2. Mikroskopischer Spermatozoen-Nachweis am  
Flecken mittels Färbemethoden
  - a) Methode nach HANKIN
  - b) Methode nach WINDSOR
  - c) Methode nach ELLERMANN
  - d) Methode nach CORIN und STOCKIS
  - e) Methode nach BAECCHI
  - f) Methode nach HEKTOEN und RUKSTINAT
  - g) Methode nach MARIQUE (STRASSMANN)
3. Mikroskopischer Spermatozoen-Nachweis in  
Fleckenextrakten mittels Färbemethoden
  - a) Methode nach BOHNÉ und DIECKMANN
  - b) Färbung nach MAY-GRÜNWALD (STRASSMANN)
  - c) Färbung nach GRAM (STRASSMANN)
4. Mikroskopischer Spermatozoen-Nachweis nach  
Zerstörung des Stoffgewebes durch konzentrierte  
 $H_2SO_4$  (POLLAK)

### III. Kristall- und chemische Reaktionen

1. Methode nach FLORENCE (Cholin-Nachweis)
2. Methode nach PURANEN (Spermin-Nachweis)
3. Methode nach FUCHS und TOKUOKA (Farbreaktion mit basischem Kupferkarbonat)
4. Methode nach BASTERO (quantitative Bestimmung der Spermamenge in Flecken)

### IV. Biochemische Nachweise

1. Nachweis von Histaminase (Diaminooxydase) (BERG)
2. Nachweis von Hyaluronidase (LAVES)
3. Nachweis von saurer Phosphatase (BERG, BOLTZ und PLOBERGER)
4. Nachweis von Kreatin-Phosphokinase (GRIFFITHS und LEHMANN)

### V. Papierchromatographische Methoden (s.u.)

1. Methode nach FIORI (v. GÜTLINGEN)
2. Methode nach THOMA, KOLL und FISCHER
3. Methode nach LEVONEN

### VI. Immunologische Methoden mit Hilfe des präzipitierenden Anti-Humansperma-Serums

Aufgabe dieser Arbeit war es, folgende Methoden auf ihre Verwendbarkeit für die gerichtsmedizinische Praxis zu prüfen:

1. die papierchromatographische Nachweismethode nach LEVONEN,

2. die Anwendung des von den Behringwerken in den Handel gebrachten Anti-Humansamenplasma-Serums mittels der Agar-Diffusionsmethode,
3. den enzymatischen Nachweis von CPK in Spermafleckenextrakten.

## B. Die papierchromatographische Nachweismethode

Die papierchromatographische Methode als Nachweisverfahren von Spermaflecken ist erstmals 1955 und 1957 von FIORI beschrieben worden. 1959 war es die Arbeitsgruppe um THOMA und 1960 LEVONEN, die versuchten, auf papierchromatographischem Wege Spermaflecken zu identifizieren. Allen diesen Arbeiten liegt als Prinzip die Extraktion der organischen Base Spermin aus einem Spermaspurenträger und ihr Nachweis im Chromatogramm zugrunde. Seit langem ist bekannt, daß Spermin in hoher Konzentration im Sperma vorkommt. Bereits 1936 entwickelte PURANEN auf Grund dieser Tatsache seine Nachweismethode für menschliche Samenspuren (s.o.).

### 1. Das Verfahren von LEVONEN

Das Spermin liegt fest an Phosphat gebunden im Sperma vor und läßt sich daher bei der Extraktion schlecht aus dem Spurenräger lösen. LEVONEN verwendet 20 % Trichloressigsäure; die Fällung der Spermaproteine kann sich dann nicht mehr störend im Chromatogramm auswirken. Bei der Arbeitsweise von LEVONEN wird neben dem Spermin noch eine andere organische Base im Chromatogramm dargestellt: das Cholin, das im Sperma in einer Konzentration von 200-300 mg-% vorkommt. LEVONEN gibt als Rf-Werte 0,32 für Spermin und 0,74 für Cholin an.

Arbeitsvorschrift nach LEVONEN

1. Ein Stück des fraglichen Stoffes ( $1 - 2 \text{ cm}^2$ ) fein zerschneiden und mit 1 ml 20% Trichloressigsäure im Zentrifugenröhrchen durchtränken.
2. Nach 15 min den Stoff mit einem Glasstab auspressen und entfernen.
3. Die Flüssigkeit 15 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugieren und den Überstand in einen kleinen Scheidetrichter dekantieren.
4. 1 ml Aqua dest. und 2 ml Äther hinzugeben und 2 min schütteln.
5. Die Ätherschicht verwerfen und die Wasserschicht noch 2mal mit je 2 ml Äther waschen.
6. Die Wasserschicht auf einem Wasserbad eindampfen und den Rückstand mit 1 Tropfen 0,5 n HCl auflösen.
7. Chromatographiepapier: Whatman Nr. 1, 25 x 25 cm. Eine Linie mit 2,5 cm Abstand von einer Kante ziehen, sodann die Probe oder Proben entlang dieser Linie in Abständen von 4 cm auftragen.
8. Als Vergleich 0,01 ml einer Lösung auftragen, die 1 mg Spermin und 5 mg Cholin pro ml Aqua dest. enthält.
9. Das Papier wird zum Zylinder geformt und in eine Kammer gebracht. Es kann auch jedes Glasgefäß genommen werden, das hoch genug ist und dicht abschließt.
10. Die Steigflüssigkeit soll etwa 2 cm hoch stehen.

Steigflüssigkeit:

50 ml Isopropanol p. a.

10 ml Essigsäure p. a.

40 ml Aqua dest.

Die Steigflüssigkeit soll einige Stunden in der Kammer stehen, bevor das Chromatogramm eingebracht wird. Es bleibt etwa 5 Stunden, oder bis der obere Rand der Steigflüssigkeit das Ende des Papiers erreicht hat, in der Kammer.

11. Bei Zimmertemperatur trocknen lassen und dann mit Dragendorff's Reagens besprühen.

Dragendorff's Reagens:

Lösung A:

850 mg Wismutnitrat  
40 ml Aqua dest.  
10 ml Eisessig p.a.

Lösung B:

8 g Kaliumjodid  
20 ml Aqua dest.

Zum Gebrauch:

5 ml der Lösung A mit 5 ml der Lösung B mischen und 20 ml Eisessig hinzufügen, sodann mit Aqua dest. auf 100 auffüllen.

LEVONEN erprobte diese Methode an Flecken mit normalem Sperma und an Spermaflecken von Patienten mit Oligospermie und Azoospermie. Dabei ließen sich Unterschiede im Chromatogramm nicht feststellen. Weiterhin arbeitete sie mit Spermaflecken auf verschiedenen Stoffarten. Die Chromatogramme waren stets gleich. Die Organspezifität des chromatographischen Nachweises von Spermin und Cholin aus Spermaflecken wies LEVONEN durch Kontrollversuche mit Eiter, Blut, Nasensekret, Vaginalsekret, mit Vaginalsekret einer Leiche, mit Speichel, Urin und Faeces nach. Dabei zeigte sich das Spermin als völlig

samenspezifisch, während Cholin auch in einigen Körperabsonderungen nachweisbar war; jedoch reagierte es bei weitem nicht so eindeutig wie beim Samen.

## 2. Eigene Versuche

Die chromatographische Methode nach LEVONEN wurde an Spermaflecken aus grobem Leinengewebe nachgeprüft. Die Flecken waren mindestens älter als einen Monat.

### a) Vorversuche

#### Versuch Nr. 1

Der erste Versuch beschränkte sich auf die Herstellung der Spermin- und Cholin-Vergleichslösung und auf Vorversuche mit dieser Lösung. Es wurde eine Lösung hergestellt, die pro ml Aqua dest. 1 mg Spermin und 5 mg Cholin enthielt. Mit der Mikrowaage wurden nacheinander 5 mg Spermin (SERVA, Heidelberg) und 25 mg Cholin (SCHUCHARDT, München) abgewogen und beide Substanzen in ein verschließbares Glasröhrchen gegeben. Mit der Pipette wurden 5 ml Aqua dest. hinzugefügt, und die Substanzen unter Schwenken des Röhrchens gelöst.

Im Kühlschrank ist diese Lösung mehrere Wochen haltbar. Sie muß neu angesetzt werden, wenn die Farbe des Cholins und des Spermins im Chromatogramm blasser wird, und wenn die Konturenschärfe der Flecken nachläßt.

Zum Vergleich wurde eine Lösung angesetzt, die 2 mg Spermin und 10 mg Cholin pro ml Aqua dest. enthielt. Von beiden Lösungen wurden jeweils 10 cmm auf das

Ederol-Chromatographiepapier Nr. 202, ein in seinen Eigenschaften dem Whatman-Papier Nr. 1 entsprechendes Papier, im Abstand von mindestens 3 cm aufgetragen, nachdem zuvor entlang der Schmalseite des Papiers im Abstand von 2,5 cm von der unteren Kante eine Linie gezogen worden war. Die Maße des Papiers sind 15 x 50 cm. Anschließend wurde das Papier so in die Kammer gehängt, daß der untere Rand gerade in das Fließmittel tauchte. Da das Fließmittel nach 5 Stunden erst etwa 10 cm gelaufen war, wurde das Papier noch weitere 5 Stunden in der Kammer belassen. Dann wurde es entfernt, und die Fließmittelfront markiert. Nach Trocknenlassen bei Zimmertemperatur wurde es mit Dragendorff's Reagens besprüht.

Im Chromatogramm zeigten sich sehr schöne, gut sichtbare Cholin- und Sperminflecke mit scharfer Kon-  
turenzeichnung. Die Konzentrationen von 1 mg Spermin und 5 mg Cholin pro ml reichten völlig aus, um ausgezeichnete Ergebnisse mit der Vergleichslösung zu erzielen. Daher wurde für alle weiteren Versuche diese Konzentration der Vergleichslösung gewählt. Die Farbe des Cholins war blauviolett, während sie bei der doppelten Menge des Cholins mehr zum rotvioletten hin ging. Spermin zeigte sich bei beiden Konzentrationen in einer rosaroten Farbe.

Um Unreinheiten der Glasgefäße auszuschalten, wurden diese mit Bichromat-Schwefelsäure gereinigt und anschließend mit Leitungswasser und dest. Wasser gründlich gespült.

## Versuch Nr. 2

Aus einem Spermaflecken <sup>1)</sup> wurde ein etwa 1 cm<sup>2</sup> großes Stück herausgeschnitten und zerkleinert. Die Stoffschnittelchen wurden in einem Zentrifugenröhrchen mit 1 ml 20% Trichloressigsäure durchtränkt und mit einem Glasstab ausgepreßt. Die Stoffstückchen wurden dabei zu dünnen Fäserchen zerrieben. Nach 15 min wurde versucht, mit einem Glasstab diese Fäserchen auszu-pressen und zu entfernen, was jedoch nicht vollständig gelang. Sodann wurde die Lösung 15 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Es zeigte sich, daß sich die in der Lösung verbliebenen Fäserchen sofort nach dem Zentrifugieren mit Flüssigkeit vollsaugten und in der Lösung schwebten. Darum wurde ganz auf das Zentrifugieren verzichtet, und bei den weiteren Versuchen wurden die Stoffreste mit Hilfe einer Glassinternutsche entfernt. So wurde eine völlig stoffrestfreie Lösung gewonnen. Sie wurde in einen Scheidetrichter gegossen und mit 1 ml Aqua dest. und 2 ml Äther versetzt. Nach 2 min Schütteln wurde die Ätherschicht verworfen und die Wasserschicht noch 2mal mit je 2 ml Äther gewaschen. Die Wasserschicht wurde auf einem Uhrglas aufgefangen und im Brutschrank bei einer Temperatur von 100° C eingengt. Diese Art der Einengung wurde dem Verdampfen auf dem Wasserbad vorgezogen, weil sie bedeutend weniger

---

<sup>1)</sup> Herrn Prof. Dr. BRAUN-FALCO, Direktor der Dermatologischen Klinik der Universität Marburg, sei für die freundliche Überlassung des anlässlich von Fertilitätsuntersuchungen gewonnenen Materials herzlich gedankt.

zeitraubend war. Der Rückstand wurde mit 1 Tropfen 0,5 n HCl aufgelöst. Sowohl die Spermin-Cholin-Vergleichslösung, als auch der Spermafleckenextrakt wurde auf das Chromatographiepapier, wie oben beschrieben, aufgetropft und chromatographisch entwickelt.

Bei der Vergleichslösung stellten sich Spermin und Cholin wiederum sehr gut dar, beim Spermaextrakt zeigte sich etwas unterhalb des Cholinfleckes der Vergleichslösung deutlich ein runder, rotvioletter Fleck, der nach LEVONEN als Cholinleck gedeutet werden durfte. Auch sie beobachtete das Phänomen, daß das Cholin aus dem Fleckenextrakt nicht ganz so schnell im Chromatogramm wandert wie das Vergleichs-Cholin. Sie führt dies auf Unreinheiten im Fleckenextrakt zurück. Die etwas intensivere rotviolette Farbe des Cholins aus dem Extrakt gegenüber der blasseren Farbe des Vergleichs-Cholins überraschte nicht, da aus Versuch Nr. 1 bekannt war, daß das Cholin mit Zunahme der Konzentration mehr zum rotvioletten hin tendiert. In Höhe des Vergleichs-Spermins lag in derselben Farbe beim Spermafleckenextrakt ein länglicher Fleck vor, und es bestand kein Zweifel, daß es sich hier um Spermin handelte. Der Fleck war deutlich, allerdings waren die Grenzen des Fleckes nach oben und unten unscharf.

Weitere Versuche (3 - 4) zeigten, daß durch die Verlängerung der Fleckenextraktion mit Trichloressigsäure nicht mehr Spermin und Cholin herausgelöst werden konnte. Eine Vergrößerung des zu untersuchenden Stoff-

stückchens brachte lediglich eine Vergrößerung der Flecke im Chromatogramm. Interessante Ergebnisse zeigten die folgenden Versuche:

#### Versuch Nr. 5

Der wie in Versuch Nr. 2 erzeugte Spermafleckenextrakt wurde auf das Chromatographiepapier aufgetropft und 2 bis maximal 3 h in der Kammer konditioniert; erst dann wurde der untere Rand des Papiers in das Fließmittel getaucht. Es ergab sich eine bessere und schärfere Darstellung der Sperminflecke. Bei den weiteren Versuchen wurde das Papier stets 2 bis 3 h konditioniert.

#### Versuch Nr. 6

In allen Versuchen hatte das Cholin aus den Fleckenextrakten eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als das Cholin der Vergleichslösung. Es mußte also der Beweis erbracht werden, daß die Farbflecke im Chromatogramm wirklich durch Cholin erzeugt wurden. Dieser Beweis wurde durch eine chromatographische Reinigung des Cholins erbracht.

Spermafleckenextrakt wurde chromatographisch getrennt in Cholin und Spermin. Lediglich das Cholin der Vergleichslösung wurde durch das Besprühen mit Dragendorff's Reagens sichtbar gemacht, zur ungefähren Bestimmung, wo das Cholin des Extraktes sich befinden mußte. Dieser vermutete Cholinleck wurde aus dem Papier herausgeschnitten und genauso behandelt wie der Sperma-



Abb. 1: Chromatographisch gereinigtes Cholin aus Spermaflecken.

a = Cholin-Spermin-Vergleichslösung;

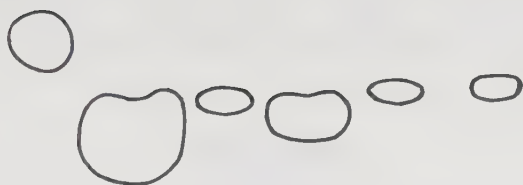
1 = gereinigtes Cholin aus einem Spermaflecken;

2 = Kontrolle zu 1

fleck bei Versuch Nr. 2. Nach 3 mißglückten Versuchen gelang es, das gereinigte Cholin chromatographisch darzustellen, und diesmal lagen Cholin des Extraktes und das der Vergleichslösung in einer Höhe (Abb. 1). Mit diesem Versuch wurden die Vorversuche abgeschlossen.

Die ermittelte optimale Arbeitsvorschrift, mit der die weiteren Versuche gemacht wurden, lautet:

1. Ein Stück des fraglichen Stoffes ( $1 \text{ cm}^2$ ) fein zerschneiden und mit 1 ml 20% Trichloressigsäure im Zentrifugenröhrchen durchtränken.
2. Den Stoff mit einem Glasstab zu kleinen Fäserchen zerreiben.
3. Nach 15 min die Stofffäserchen mit Hilfe einer Glas-sinternutsche entfernen und die Flüssigkeit in kleinen Scheidetrichter gießen.
4. und 5.: siehe Arbeitsvorschrift nach LEVONEN
6. Die Wasserschicht auf einem Uhrglas auffangen und im Brutschrank bei einer Temperatur von  $100^{\circ} \text{C}$  vollständig einengen. Den Rückstand mit 1 Tropfen 0,5 n HCl auflösen.
7. Chromatographiepapier: Ederol-Chromatographiepapier Nr. 202. Entlang der Schmalseite des Papiers im Abstand von 2,5 cm von der unteren Kante eine Linie ziehen und die Probe oder Proben entlang dieser Linie in Abständen von mindestens 3 cm auftragen.
8. siehe LEVONEN
9. Das Papier wird in einer etwa 50 cm hohen Kammer 2 bis maximal 3 h konditioniert und dann in das Fließmittel eingetaucht.



A B A B B

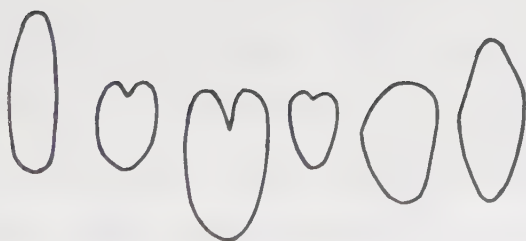


Abb. 2: Verschiedene Spermafleckengröße;

a = Cholin-Spermin-Vergleichslösung;

1 = 2 cm<sup>2</sup> großer Spermaflecken; 2 = 1 cm<sup>2</sup>;

3 = 0,5 cm<sup>2</sup>; 4 = 0,25 cm<sup>2</sup>; 5 = 0,125 cm<sup>2</sup>;

A und B = Spermaflecken verschiedener Patienten.

Rf-Werte für Cholin: 0,7 - 0,75

Rf-Werte für Spermin: 0,28 - 0,32

10. und 11.: siehe LEVONEN

Es ist darauf zu achten, daß die Kammer dicht schließt, da Isopropanol und Essigsäure des Fließmittels leicht verdampfen und sich die Zusammensetzung des Fließmittels infolgedessen ändern würde.

## b) Hauptversuche

### Versuch Nr. 7

Mit diesem Versuch sollte festgestellt werden, bei welcher Spermafleckengröße die chromatographische Methode noch positive Ergebnisse zeigt. Die untersuchten Stoffstückchen wurden aus Spermaflecken von zwei Patienten ausgeschnitten, und zwar aus Spermafleck A Stückchen der Größe  $2 \text{ cm}^2$  und  $0,5 \text{ cm}^2$ , aus Spermafleck B Stückchen der Größe  $1 \text{ cm}^2$ ,  $0,25 \text{ cm}^2$  und  $0,125 \text{ cm}^2$ . Die Entwicklung dieser Spermafleckenextrakte brachte einen sehr interessanten Nebebefund: im Spermafleckenextrakt A konnte viel Cholin und wenig Spermin und im Spermaflecken B wenig Cholin und viel Spermin nachgewiesen werden. Dieser zufällige Befund konnte in späteren Versuchen bestätigt werden. Diese Erscheinung läßt auf eine individuelle Wechselbeziehung in der Konzentration von Cholin und Spermin schließen.

Neben diesem Befund zeigte der Versuch, daß sich selbst bei einer Fleckengröße von nur  $0,125 \text{ cm}^2$  ein eindeutig positives Ergebnis erzielen ließ. (Abb. 2).

Bei einem anderen Spermafleck, an dem der Versuch wiederholt wurde und bei dem die Sperminkonzentration

ebenfalls größer war als die CholinKonzentration, zeigte sich Spermin noch bei einer Fleckengröße von  $0,125 \text{ cm}^2$  im Chromatogramm, während sich Cholin bei der Fleckengröße von  $0,25 \text{ cm}^2$  nicht mehr darstellte. In wieder einem anderen Falle lagen die Verhältnisse genau umgekehrt.

#### Versuch Nr. 10

Mit diesem Versuch wurde die Spezifität der Methode nachgeprüft. Folgende Körperflüssigkeiten wurden auf ihren Gehalt an Spermin und Cholin geprüft: Blutserum, Urin, Vaginalsekret<sup>1)</sup>, Menstrualblut<sup>1)</sup> und Speichel.

Es wurden Flecken aus diesen Materialien hergestellt und in gleicher Weise behandelt wie Spermaflecken. Die Ergebnisse waren für Spermin eindeutig negativ, während hauchzarte Verfärbungen des Papiers beim Vaginalsekret und beim Menstrualblut möglicherweise cholinspezifisch waren. Diese Andeutungen von Farbflecken lassen sich jedoch in keiner Weise mit den intensiven Farbflecken des Cholins bei Spermaflecken vergleichen.

---

<sup>1)</sup>Herrn Prof. Dr. BUCHHOLZ, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Marburg, sei für die freundliche Überlassung von Untersuchungsmaterial herzlich gedankt.

### 3. Besprechung

Im wesentlichen wurde die Arbeitsvorschrift von LEVONEN beibehalten; lediglich geringe technische Änderungen wurden vorgenommen, durch die der Zeitaufwand erheblich verringert werden konnte. Wichtig ist, daß durch 2- bis 3stündiges Konditionieren des Chromatographiepapiers eine bessere Konturenschärfe der Sperminflecke erzielt werden konnte.

Bei der Nachprüfung der Methode nach LEVONEN waren sämtliche Versuche positiv. Bei den meisten Versuchen traten die Cholinflecke deutlicher in Erscheinung als die Sperminflecke. Bei einigen Versuchen waren jedoch die Cholinflecke klein und blaßblauviolett, die Sperminflecke dagegen selbst bei der minimalen Fleckengröße von nur  $0,125 \text{ cm}^2$  groß und gegen die Umgebung scharf begrenzt. Diese Beobachtung bestätigt den von den Kristallreaktionen her bekannten Befund, daß nämlich bei positiven Ergebnissen mit der Methode nach FLORENCE (Cholinnachweis) die Probe nach PURANEN negativ ausfallen kann und umgekehrt. Bedenkt man, daß das schlecht-lösliche Spermin nach PURANEN aus dem Zeugfleck mit Kochsalzlösung - ein im Vergleich zu einer Säure schlechtes Lösungsmittel - extrahiert wird, so wird verständlich, daß die Methode nach PURANEN bei relativ geringer Sperminkonzentration im Zeugfleck trotz eindeutiger positiver FLORENCE-Probe versagen kann. Daher ist ein Chromatogramm, auch wenn es nur Spuren von Spermin erkennen läßt, sich aber ein deutlicher, rot-

violetter Cholinfleck darstellt, als positiv zu bezeichnen.

C. Versuche mit präzipitierendem  
Anti-Humansamenplasma-Serum

1. Literatur

Der Gedanke, Spermaflecken auf immunologischem Wege zu identifizieren, wurde erstmals wach, als es UHLENHUTH 1901 gelang, mit Hilfe der Präzipitinreaktion die verschiedenen Artproteine zu differenzieren. Seit dieser Zeit ermöglichte das in Spermaflecken angetrocknete Protein - mit der Einschränkung von Verwandtschaftsreaktionen bei Menschenaffen - die Artdiagnose des angetrockneten Materials.

Um diese Zeit wurde von METCHNIKOFF und METALNIKOFF die Erkenntnis gewonnen, daß das Sperma auch organspezifisches Antigen enthielt. Im Jahre 1899 und 1900 beobachteten diese Autoren ein schnelleres Erlöschen von Spermien auf dem Peritoneum von gegen Sperma sensibilisierten Meerschweinchen im Vergleich zu den nicht sensibilisierten Tieren. Das Antispermaserum wirkte immobilisierend und agglutinierend auf die Spermien. Viele Autoren haben sich seither mit der Frage nach den Eigenheiten von Sperma-Antigen beschäftigt. Die folgende chronologische Aufzählung gibt ein Bild von der Entwicklung dieser Forschung.

1902 erzeugte FARNUM ein organspezifisch präzipitierendes Kaninchenserum gegen Sperma.

PFEIFFER stellte 1905 fest, daß im Serum von gegen Sperma sensibilisierten Tieren organspezifische Präzipitine gegen Sperma auftraten. Durch elektive Absorption gelang es, artspezifische Partialpräzipitine auszuschalten, so daß PFEIFFER ein organspezifisch präzipitierendes Serum erhielt. Die Antigeneigenschaft zeigte sich auch im Anaphylaxieversuch.

1921 und 1922 stellten DERVIEUX und HEKTOEN und MANLY präzipitierende Antiseren des Kaninchens gegen menschliches Serum her. HEKTOEN und MANLY erzeugten, wie schon vor ihnen PFEIFFER, ein organspezifisch präzipitierendes Antispermaserum durch Absorption des Blutes von gegen menschliches Sperma sensibilisierten Kaninchen mit menschlichem Blutserum.

LANDSTEINER und v.d. SCHEER berichteten 1927 über ein komplementbindendes Antispermaserum.

MUDD wies im Sperma organspezifisches Protein durch die Agglutation von Spermin in einem Antiserum gegen menschliches Sperma nach.

HENLE, HENLE und CHAMBER führten 1938 den Nachweis von organspezifischem Eiweiß durch den Agglutinationstest von Spermien und die Komplementbindungsreaktion. Ihr Antispermatozoenserum reagierte nur mit den Spermien und nicht mit dem Blutserum der gleichen Species.

ROSS sensibilisierte 1946 Kaninchen gegen menschliches Sperma und erzeugte ein organspezifisch präzipi-

tierendes Serum. Er stellte fest, daß das im Sperma enthaltene Albumin kräftig von einem Antiserum gegen menschliches Serum präzipitiert wird, selbst aber ein schlechtes Antigen ist. Das Antiserum gegen menschliches Sperma präzipitierte kaum das Albumin des menschlichen Blutserums, eine Beobachtung, die LEITHOFF bestätigen konnte.

Zur Organdiagnose ist das in menschlichen Spermaflecken angetrocknete Protein während dieser Zeit nur von wenigen Autoren herangezogen worden. So stellte z.B. PFEIFFER 1905 durch elektive Absorption ein spezifisch präzipitierendes Antiserum gegen menschliches Sperma her und verwandte es zum Spermafleckennachweis.

MINET und LECLERCQ identifizierten 1911 Spermaflecken mit Hilfe der Anaphylaxiereaktion sensibilisierter Meerschweinchen. Diese Methode ist wegen mangelnder Spezifität wieder aufgegeben worden.

HEKTOEN und RUKSTINAT berichteten 1928 über die erfolgreiche Identifizierung menschlicher angetrockneter Spermaflecken mit Hilfe spezifisch präzipitierender Antispermaseren. Die Autoren fanden, daß bei der Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Sperma Seren entstanden, die deutlich Anti-Mensch-Charakter hatten. Durch elektive Absorption des Antispermaserums mit einer gleichen Menge von 1:200 verdünntem Blutserum konnte ein samenspezifisches Antiserum gewonnen werden, durch das der Spermafleckennachweis gelang.

POLLAK empfahl 1943 die Artdifferenzierung des Proteins von Spermaflecken mit Antiseren gegen mensch-

liches Sperma, da auf diese Weise zugleich die Artdiagnose von Sperma möglich sei.

1959 identifizierten WEIL, WILSON und FINKLER mit Hilfe eines komplementbindenden Antispermaserums Spermaspuren im oder in der Umgebung des weiblichen Genitale nach einem Coitus.

In der deutschsprachigen Literatur wurde LEITHOFF zufolge die praktische Ausführbarkeit des Spermanachweises mit spezifisch präzipitierenden Antiseren schlecht beurteilt. Die Herstellung von entsprechenden Antiseren war schwierig und erforderte eine große Zahl von Tieren; auch die Technik des Spermanachweises war nicht befriedigend.

Die Präzipitinmethode, die in dieser Zeit gebräuchlichste Methode, ließ eine sichere Beurteilung nicht zu. Nach MULLER und FONTAINE unterliegt das Ablesen der Reaktion, die sich im Hämolyse-Röhrchen vollzieht, zum großen Teil einer subjektiven Beurteilung. Es muß die Beschaffenheit von Antigenlösung und Immunsorum berücksichtigt werden, nämlich, ob diese klar und durchsichtig oder mehr oder minder trübe sind. Daher wurde von MULLER und FONTAINE 1946 ein neues Vorgehen vorgeschlagen. Sie mischten Immunsorum mit der gleichen Menge eines Gelatinierungsmittels, und zwar mit 4 %iger Gummilösung. Diese Mischung gossen sie in ein sauberes Hämolyse-Röhrchen und setzten dann die Mazerationsflüssigkeit hinzu. Nach 12 - 24 h zeigten sich unter der Trennungslinie zwischen dem Immunsorum und der

Lösung verschiedene deutliche Präzipitationszonen.

Auch die Agglutinationsmethode und die Komplement-bindungsreaktion waren in jener Zeit geschätzte Methoden der biologischen Eiweißdifferenzierung. Sie waren aber zu wenig spezifisch und zu sehr von der subjektiven Ablesung abhängig.

In neuerer Zeit wurden immunchemische Methoden entwickelt, die für die biologische Eiweißdifferenzierung neue Möglichkeiten lieferten, und die auch für die gerichtsmmedizinische Praxis von Bedeutung wurden: es sind die Agardiffusionsmethode nach OUCHTERLONY und ihre Mikromodifikationen, die Immunelektrophorese nach GRABAR und BURTIN und ihre Mikromethoden.

CULLIFORD entwickelte eine immunelektrophoretische Technik zur Differenzierung von Blut-, Sperma- und Speichelflecken. Der spezifische Spermanachweis scheiterte jedoch am Mangel organspezifischer Antiseren.

WEIL und Mitarbeiter erzeugten unter Zuhilfenahme von Freund's Adjuvans hochwertige, organspezifische Antiseren gegen Menschen- und Kaninchen-Sperma. Erstmals verwandten diese Autoren neben anderen immunologischen Techniken die Agar-Diffusionsmethode, und diese gestattete die Erkennung von 5 Antigenkomponenten im menschlichen Sperma. Am Spermaflecken wurde jedoch nicht gearbeitet.

Die obengenannten Methoden erlaubten auch die Erkennung von verschiedenen Bluteiweißkörpern im Sperma. MULLER und FONTAINE fanden bei Verwendung der Agar-

Diffusionsmethode eine Präzipitationslinie zwischen Spermafleckenextrakt und Anti-Humanserum vom Pferd. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit des präzipitierten Proteins folgerten sie, daß es sich dabei um Albumin handeln müsse. Auf diese Weise konnten sie die Art-diagnose der Flecken stellen. Eine Organdiagnose war natürlich nicht möglich, da Anti-Humanserum noch mit vielen anderen Körperflüssigkeiten Kreuzreaktionen gibt. Über Untersuchungen der Bluteiweißkörper im menschlichen Samen berichten HERMANN, LICHT und KEUTEL sowie LEITHOFF und LEITHOFF. Die Letztgenannten konnten mit dem Anti-Humanserum des Kaninchens im Samenplasma bis zu 11 Präzipitate immunoelektrophoretisch darstellen. Durch diese Arbeiten wurde weitgehend geklärt, welche Spermaproteine den Mensch-Charakter bedingen - wie er bei der Herstellung organspezifischer Antispermaseren von vielen Autoren beobachtet wurde.

LEITHOFF und LEITHOFF berichteten 1962 über die erfolgreiche immunoelektrophoretische Identifizierung von Spermaflecken mit Hilfe eines Anti-Humansperma-Serums. Sie erzeugten ein organspezifisch präzipitierendes Antispermaserum durch Absorption mit Blutserum. Mit diesem Antiserum konnten sie gegen menschliches Samenplasma bis zu 8 Präzipitate erzielen. Die in gleicher Weise untersuchten Eluate aus Flecken von menschlichem Blutserum, Urin und Speichel, von Kuhmilch, von flüssigem und angetrocknetem Bullensperma, sowie von dem angetrockneten Sperma eines Ziegenbockes gaben immunoelektrophoretisch mit dem Anti-Spermaserum keine Präzipitate.

Die Autoren konnten ein Präzipitationsschema aufstellen, wie sie es in typischer Weise bei menschlichen Samenspuren fanden.

1964 prüften LEITHOFF und GENKEL erstmals das von den Behringwerken hergestellte Anti-Humansamenplasma-Serum. Sie fanden, daß auch mit diesem Serum in der Immunelektrophorese Präzipitationsbilder der organspezifischen Proteine des Samenplasmas zu erzeugen waren, die ihren Beobachtungen mit dem selbsthergestellten Anti-Humansperma-Serum glichen.

1966 erzeugten die amerikanischen Autoren MISCHLER und REINEKE ein Anti-Humansperma-Serum, mit dem sie gegen menschlichen Samen mittels der Agar-Diffusionsmethode nach OUCHTERLONY bis zu 6 Präzipitate erzielen konnten. Bei Prüfung der Organspezifität reagierte das mit Blutserum absorbierte Anti-Humansperma-Serum nicht mit Humanserum, ebenfalls nicht mit Urin. Gegen menschlichen Speichel zeigte sich eine feine Präzipitationsbande, die jedoch mit keiner der Banden, die gegen Samen gefunden wurden, identisch war. Die Autoren sind der Ansicht, mit Hilfe eines Anti-Humansperma-Serums bei entsprechenden Kontrollen einen organspezifischen Spermafleckennachweis führen zu können.



## 2. Eigene Versuche

Mit Hilfe der Agar-Diffusionsmethode wurde geprüft, ob sich das von den Behringwerken in den Handel gebrachte Anti-Humansamenplasma-Serum zum Spermafleckennachweis eignete. Als Arbeitsvorschrift diente die Mikromethode auf Objektträgern, wie sie von HARTMANN-TOILLIEZ, MANSI, YAKULIS-HELLER ausgearbeitet und schließlich vor allem von FIORI (1960) und FIORI und MARTIGO in einer als optimal ermittelten Technik angegeben wurde. Als Spermaflecken diente mit Sperma getränktes Leinengewebe.

### Versuchsreihe 1

Aus einem Spermaflecken wurde ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück kleinzerschnitten und mit 1 ml Aqua dest. 12 - 24 h eluiert. In einem Erlenmeyer-Kölbchen wurde

eine 1% Agarlösung hergestellt und im siedenden Wasserbad erhitzt, bis ein wasserklares Sol entstand. Als Konservierungsmittel wurden einige Tropfen Cialit (1:5000) zugesetzt. Dann wurden mehrere Objektträger mit Alkohol fettfrei gemacht, und auf die genau waagrecht liegenden Objektträger wurden mit einer Pipette je 3 ml heißer Agarlösung aufgebracht. Eine Stunde wurde gewartet, bis der Agar fest war, dann wurde mit einem Objektträger jeweils ein Ende der mit Agar beschickten Objektträger zum Beschriften von Agar befreit. Mit einer Stahlstanze (Abbildung bei SCHLEYER) und Wasserstrahlpumpe wurde jeweils eine Sechserrosette aus dem erstarrten Gel ausgestanzt. Es zeigte sich, daß bei diesem Vorgehen mehrere Objektträger verunglückten. Es ist ratsam, die Wasserstrahlpumpe nicht zu weit aufzudrehen, da sonst der Agar vom Objektträger abgehoben wird, und die in die Höhlungen gebrachten Flüssigkeiten zwischen Agar und Objektträger abfließen. Weiterhin sollen die Löcher aus dem Gel möglichst scharfrandig ausgestanzt werden.

Jeweils in die Zentralhöhlung wurde mit einer Kapillare das Anti-Humansamenplasma-Serum eingebracht, und in die Löcher der Peripherie wurde das Eluat des Spermafleckens gegeben. Die so beschickten Objektträger wurden etwa 12 h in einer feuchten Kammer belassen und dann besichtigt. Zu jedem Versuch wurden gleichzeitig mehrere Kontrollversuche angesetzt.

Es zeigte sich, daß die ersten Versuche völlig mißglückt waren. Selbst mit der Lupe war auch die Andeutung

einer Präzipitation nicht zu sehen. Als Ursache wurde die zu geringe Füllung der Höhlungen mit Antiserum und Spermafleckenextrakt angenommen.

### Versuchsreihe 2

Nach Herstellen der Agarplatten und Ausstanzen der Sechserrosetten wurden die Höhlungen so gefüllt, daß die Flüssigkeiten mit einer kleinen Kuppe das Agarniveau überragten, und zwar so, daß Antigen und Antiserum nicht konfluieren, was gelegentlich doch geschah. Daher ist es empfehlenswert, einige mit Agar beschickte Objektträger in Reserve zu haben. Bei der Beurteilung zeigte sich zwischen Antiserum und Spermafleckenextrakt eine einzige deutliche Präzipitationslinie. Die Kontrollversuche boten das gleiche Bild.

### Versuchsreihe 3

In diesen Versuchen wurde geprüft, bei welcher Fleckengröße die Präzipitinreaktion noch sichtbar wurde. Spermaflecken der Größen 2, 1, 0,5 und 0,125 cm<sup>2</sup> wurden untersucht. Um etwas mehr Material in die Höhlungen zu bringen, wurde etwa 5 - 10 min nach dem ersten Auffüllen noch einmal nachgefüllt.

Ergebnisse (s. auch Abb. 3 und 4): Der Extrakt des 2 cm<sup>2</sup> großen Spermafleckens erzeugte 5 sichtbare Präzipitationslinien. Davon waren Nr. 2 und 5 als lange, deutliche Präzipitate zu sehen, Nr. 3 und 4 und 6 stellten undeutlichere, nur jeweils an den Enden deutlicher

in Erscheinung tretende Linien dar. Mit Sicherheit ließen sich also bei dieser Fleckengröße 5 Antigenkomponenten nachweisen. Es zeigte sich, daß die Enden der Präzipitationsbanden ineinander übergingen, wenn benachbarte periphere Höhlungen mit Spermafleckenextrakt gefüllt waren, d. h. sie "koaleszierten". Dabei wurde der Winkel um so stumpfer, je näher die Banden der zentralen Höhlung lagen. Im anderen Falle liefen die Präzipitationsbanden kaum gekrümmt zur nichtgefüllten benachbarten Höhlung hin aus.

Die Präzipitate des  $1 \text{ cm}^2$  großen Fleckens unterschieden sich von den soeben beschriebenen kaum. Nur die Banden Nr. 3, 4 und 6 waren undeutlicher.

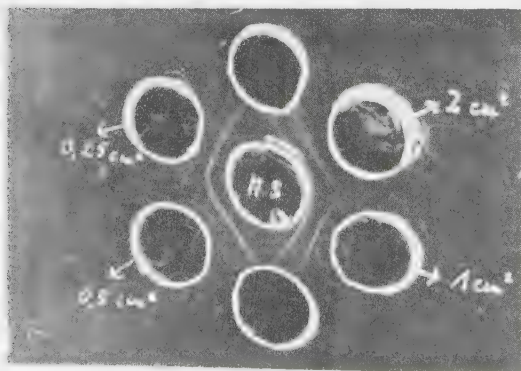


Abb. 3: Präzipitationsbanden  
bei verschiedener Spermaflek-  
kengröße

Bei der Fleckengröße von  $0,5 \text{ cm}^2$  wurde als Nr. 1 eine Bande sichtbar, die bei den vorhergehenden Fleckengrößen nicht erkennbar war. Nr. 2 war sehr deutlich, Nr. 5 nur noch an einem Ende sehr deutlich zu sehen. Nr. 3 und 4 waren kaum und Nr. 6 nicht mehr sichtbar.

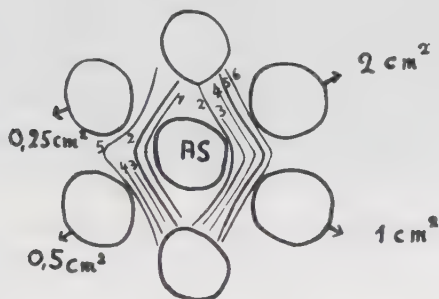


Abb. 4 Schematische Darstellung von Abb. 3

Bei der Fleckengröße von  $0,25 \text{ cm}^2$  stellten sich nur noch die Banden Nr. 1, 2 und 5 dar. Insgesamt konnten also mit diesen Versuchen 6 verschiedene Antigenkomponenten dargestellt werden.

#### Versuchsreihe 4

Aufgabe dieser Versuchsreihe war es, die Organspezifität des Anti-Humansamenplasma-Serums zu prüfen. An dieser Stelle muß ergänzend gesagt werden, daß das Anti-Humansamenplasma-Serum von den Behringwerken bereits mit menschlichem Blutserum absorbiert worden war.

Es wurden Flecken hergestellt aus Blutserum, Urin, Speichel, Vaginalsekret und Menstrualblut, und jeweils  $1 \text{ cm}^2$  dieser Flecken 12 h in 1 ml Aqua dest. eluiert. Zur Kontrolle wurde jeweils ein  $1 \text{ cm}^2$  großer Spermaflecken mit untersucht.

Gegen Sperma zeigten sich 2 deutliche Präzipitationsbanden, gegen Blutserum, Urin, Speichel und Menstrualblut war nichts zu erkennen, gegen Vaginalsekret jedoch stellte sich eine hauchzarte Bande dar. Dieser Befund wurde in einer Reihe von weiteren Versuchen kontrolliert. Dabei wurde folgendes festgestellt: wurden die Höhlungen mehrmals mit Fleckenextrakten nachgefüllt, so stellten sich außer beim Vaginalsekret auch beim Blutserum und Speichel hauchzarte Präzipitationsbanden dar. Zwar konnte man beim ersten Blick erkennen, welche Präzipitate dem Spermafleckenextrakt zuzuordnen waren - gegen Sperma stellten sich wie in der Abb. 3 sechs teils deutliche, teils weniger deutliche Banden dar - jedoch waren auch die Kreuzreaktionen gut zu erkennen. Allerdings waren die Präzipitationslinien gegen Blutserum, Speichel und Vaginalsekret so zart, daß sie sich photographisch nur schlecht darstellen ließen. Daher wurden in einem weiteren Versuch sowohl die Fleckenextrakte vom Blutserum, Speichel, Vaginalsekret und Sperma, als auch das Anti-Humansamenplasma-Serum im Vacuum-Trockenschrank bei einer Temperatur von  $35^{\circ} \text{C}$  eingengt und damit konzentriert.

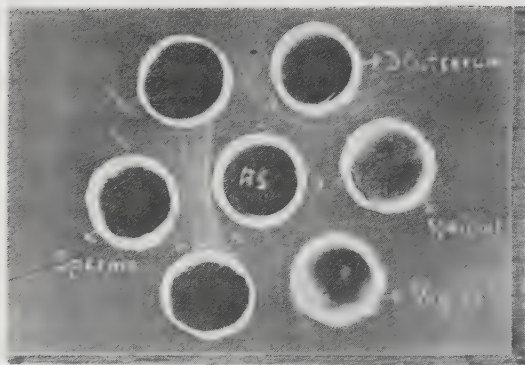


Abb. 5 Kreuzreaktion des Anti-Humansamenplasma-Serums mit Blutserum, Speichel und Vaginalsekret

Abb. 5 zeigt die Kreuzreaktionen. Sehr schön stellen sich auch die 6 Präzipitate gegen Sperma dar.

#### Versuchsreihe 5

Nach mehreren mißglückten Versuchen gelang es, durch Absorption des Anti-Humansamenplasma-Serums mit Blutserum, Speichel und Vaginalsekret ein organspezifisch präzipitierendes Antiserum zu gewinnen. Jeweils etwa 1 ml Blutserum, Speichel und Vaginalsekret wurden zu diesem Zweck im Vacuum-Trockenschrank bei 35° C vollständig eingeeengt und anschließend mit jeweils einem kleinen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Diese hochviskösen Flüssigkeiten wurden sodann mit 0,3 ml Anti-Humansamenplasma-Serum gemischt.

Bei Verwendung dieses Antiserums blieb die Präzipitinreaktion bei Blutserum, Speichel und Vaginalsekret aus; die Präzipitationsbanden gegen Sperma waren sehr deutlich, ein Zeichen, daß der Titer durch die Absorption nicht wesentlich abgeschwächt worden war.

Anschließend wurde das Anti-Humansamenplasma-Serum nur mit eingeengtem Blutserum absorbiert. Es zeigte sich, daß zwar die Präzipitine gegen Blutserum vollständig abgesättigt waren, daß aber Präzipitine des Antiserums gegen Speichel und Vaginalsekret weiterhin als Präzipitationsbanden zu erkennen waren. Damit stand fest, daß das Anti-Humansamenplasma-Serum der Behringwerke nicht nur die Eigenschaft Anti-Mensch, sondern gleichzeitig noch Präzipitine gegen Proteine des Speichels und Vaginalsekretes besaß.

### 3. Besprechung

Das Anti-Humansamenplasma-Serum der Behringwerke wurde auf seine Anwendbarkeit für die gerichtsmedizinische Praxis geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß es nicht ganz "organspezifisch" war. Es wurden Kreuzreaktionen mit Blutserum, Speichel und Vaginalsekret beobachtet, während Urin und Menstrualblut nicht reagierten.

Die Versuche zeigten, daß es bei der Untersuchung fraglicher Spermaflecken in jedem Falle ratsam ist, die Proteine der Fleckenextrakte durch schonende Einengung im Vacuum-Trockenschrank oder durch Konzentrationsdialyse anzureichern, da sich hierdurch in menschlichen Spermatrockenspuren 6 deutliche Präzipitate in typischer Anordnung darstellen lassen, während sich bei anderen biologischen Flüssigkeiten maximal nur 2 Präzipitate erkennen lassen. Auf diese Weise kann man zwar bei Anwendung des Anti-Humansamenplasma-Serums in der Form, wie die Behringwerke es zur Zeit liefern, mit Hilfe der Agar-Diffusionsmethode eindeutige Spermaflecken als solche identifizieren, jedoch ist das Antiserum ohne eine Nachabsorption nicht organspezifisch genug, um eine absolut sichere Diagnose zu stellen.

Ein wenig überrascht hat die große Menge Blutserum, die nötig war, um die Antikörper des Anti-Humansamenplasma-Serums gegen die Proteine des Blutserums abzu-

sättigen. Erst durch massives Absättigen mit angereichertem Blutserum gelang es, die Präzipitine gegen Blutserum auszuschalten.

An dieser Stelle seien ganz allgemein einige kritische Bemerkungen über die Herstellung von Immunseren eingefügt. Seit langem ist es bekannt, daß die nach kurzer Immunisierung erhaltenen Immunseren spezifischer sind als die "überimmunisierten". Nach MULLER und FONTAINE ist der Ablauf der Immunisierung derartig, als wenn das Tier zunächst gegen das heterogenste, differenzierteste und die stärkste Antigenkraft besitzende Antigen immunisiert wird. Danach erzeugt das überimmunisierte Tier Antikörper gegen die schwächeren Antigene, und diese beeinträchtigen dann die Organspezifität des Immunserums. Das geht soweit, daß das überimmunisierte Tier sogar Antikörper entwickelt, die den spezifischen ähnlich sind, so daß auf diese Weise die Artspezifität verloren gehen kann. Neben MULLER und FONTAINE haben sich KAMINSKI, FINE und die Arbeitsgruppe um DEPIEDS sehr intensiv mit diesen Fragen beschäftigt und ähnliche Beobachtungen gemacht.

Wie von den Behringwerken zu erfahren war, wurde von denselben Kaninchen durch wiederholte Immunisierung mehrmals Anti-Humansamenplasma-Serum gewonnen, und darum überrascht es nicht, daß diese Tiere im Laufe der Zeit auch Antikörper gegen unspezifische und wenig antigen wirkende Spermaproteine gebildet haben. Bedenkt man, daß z. B. LEITHOFF und LEITHOFF bis zu 11 Bluteiweißkörper im menschlichen Samen nachweisen konnten, so

wird auch die Schwierigkeit verständlich, das Anti-Humansamenplasma-Serum der Behringwerke mit Blutserum vollständig zu absorbieren.

Bislang verwandten die Behringwerke menschliches Samenplasma für die Immunisierung der Tiere. Dieses ist aber, wie die Versuche gezeigt haben, zur Gewinnung eines organspezifisch präzipitierenden Antiserums wenig geeignet. Erst, wenn es gelingt, die für Sperma spezifischen Proteine aus dem Samenplasma zu isolieren und zur Immunisierung zu verwenden, wird es möglich sein, ein organspezifisch präzipitierendes Anti-Humansamenplasma-Serum zu gewinnen. Bei Verwendung eines solchen Antiserums wäre die Agar-Diffusionsmethode ein sehr elegantes und zuverlässiges Nachweisverfahren für menschliche Spermaflecken.

D. Versuche zum Nachweis der Kreatin-Phospho-  
kinase in Spermafleckenextrakten

1. Die von GRIFFITHS und LEHMANN beschriebene  
Nachweismethode für CPK

Die Arbeiten von GRIFFITHS und LEHMANN gehen auf Beobachtungen von GREVILLE und LEHMANN zurück, die im menschlichen Sperma hohe Konzentrationen von CPK entdeckten. GRIFFITHS und LEHMANN berichteten über den gelungenen Nachweis von CPK aus Spermafleckenextrakten, und zwar bestimmten sie mittels kolorimetrischer Messung die Aktivität dieses Enzyms, das folgende Reaktionen in beiden Richtungen katalysiert:



Arbeitsvorschrift von GRIFFITHS und LEHMANN

Auf 1 - 1,5 cm<sup>2</sup> große Flecken aus verschiedenen Stoffarten wurde jeweils ein Tropfen Spermaflüssigkeit - ungefähr 0,04 ml - aufgebracht. Die bei Zimmertemperatur getrockneten Flecken wurden in 1 ml physiologischer NaCl eluiert. Die Aktivität der CPK wurde nach einer von GRIFFITHS und LEHMANN angegebenen Modifikation der Methode von ENNOR und ROSENBERG bestimmt. Der das Enzym enthaltende Fleckenextrakt wurde in Gegenwart von Kreatinphosphat und ADP inkubiert und das dabei freiwerdende Kreatin nach ENNOR und STOCKEN kolorimetrisch gemessen. Eine für diesen Zweck ebenso geeignete Methode ist nach Angaben von GRIFFITHS und LEHMANN von HUGHES im Detail beschrieben worden.

Mit der genannten Methode fanden die Autoren Enzymaktivitäten von 385 - 14000 Einheiten pro ml Extrakt. Die höchsten Aktivitäten fanden sie bei Azoospermie; der durchschnittliche Enzymspiegel lag bei 2030 E/ml. GRIFFITHS und LEHMANN gaben diese biochemische Methode als spermaspezifisch an, da sie die CPK-Aktivität in anderen Körperflüssigkeiten bedeutend niedriger fanden, wie aus der von ihnen aufgestellten Tab. zu ersehen ist.

Tab. 1. CPK-Aktivitäten in Körperflüssigkeiten nach GRIFFITHS und LEHMANN

| Flüssigkeiten          | CPK-Aktivität<br>( $\mu$ M Kreatin / ml / h) |
|------------------------|----------------------------------------------|
| Sperma                 | 385 - 14000                                  |
| Erythrozyten           | 0                                            |
| Blutserum (normal)     | 0,5 - 4,0                                    |
| Blutserum (pathol.)    | bis zu 200                                   |
| Liquor cerebrospinalis | 0 - 0,9                                      |
| Faeces                 | 0 - 10,1                                     |
| Magensaft              | 0 - 14,2                                     |
| Urin                   | 0 - 19,2                                     |
| Vaginalsekret          | 0 - 1,5                                      |

Lediglich bei pathologischen Seren, so bei Muskeldystrophie, Myokardinfarkt und Hypothyreoidismus, wurden Enzymaktivitäten bis zu 200 E/ml gemessen. Nach den Äußerungen der Autoren stellt diese Methode ein zusätzliches Verfahren dar, um fragliche Spermaflecken zu identifizieren.

## 2. Eigene Versuche

Vor einigen Jahren hat die Firma Boehringer (Mannheim) eine Testkombination zur Messung der CPK-Aktivität entwickelt. Mit Hilfe dieser Testkombination wurde versucht, CPK in Spermafleckenextrakten nachzuweisen.

### Prinzip der Methode

Die Aktivität der CPK wurde nach TANZER und GILVARG im zusammengesetzten optischen Test gemessen. Das Enzym CPK katalysiert die Gleichgewichtsreaktion



Man mißt die Aktivität der CPK mit Kreatin als Substrat. Die zeitliche Zunahme von ADP wird in der durch Pyruvat-Kinase katalysierten Hilfsreaktion



und in der durch Laktat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion



bestimmt. Meßgröße ist der DPNH-Verbrauch pro Zeiteinheit.

### Herstellung der Lösungen (Testkombination Boehringer)

Flasche 1. 2 M Glycin-Puffer, pH = 9,0; 0,001 M DPNH;  
0,006 M ATP; 0,002 M Phosphoenolpyruvat.  
Inhalt der Flasche 1 mit 15 ml bidest. Was-  
ser lösen (bei +4°C 2 Wochen haltbar)

Flasche 2. 2 mg LDH/ml; 2 mg PK/ml; 0,5 M MgCl<sub>2</sub>.  
Suspension in Flasche 2 unverdünnt verwenden  
(bei +4°C 9 Monate haltbar)

Flasche 3. 0,1 M Glycin-Puffer, pH = 9,0; 0,063 M  
Kreatin. Inhalt der Flasche 3 mit 20 ml  
bidest. Wasser lösen (bei +4°C 9 Monate  
haltbar)

Flasche 4. 0,1 M Glycin-Puffer, pH = 9,0.  
Inhalt der Flasche 4 mit 20 ml bidest.  
Wasser lösen (bei +4°C 9 Monate haltbar)

### Arbeitsweise

Benötigt wurden pro Bestimmungsansatz 2 ml Flecken-  
extrakt (s.u.). Somit wurden jeweils 2 cm<sup>2</sup> große Sperma-  
flecken klein zerschnitten und in 2,5 ml physiologischer  
NaCl 12-24 h eluiert. Mit einer Glassinternutsche wur-  
den die Stoffreste aus der Flüssigkeit entfernt, und  
diese etwa 15 min scharf zentrifugiert, so daß ein nahe-  
zu klarer Überstand resultierte.

Vor dem jeweiligen Ansetzen der Probe wurden die  
Lösungen 1 - 4 auf Zimmertemperatur gebracht. Sämtliche  
für den Versuch benötigten Glasgeräte wurden mit  
Bichromat-Schwefelsäure gereinigt und anschließend

mit Leitungswasser und bidest. Wasser gespült.

Bestimmungsansatz (nach Vorschrift von Boehringer)

Für jede Probe wurde ein Leerwert angesetzt, und gegen diesen Leerwert wurde gemessen. In je ein Reagensglas wurde pipettiert:

|                | Probe   | Leerwert |
|----------------|---------|----------|
| Fleckenextrakt | 1,00 ml | 1,00 ml  |
| Lösung 1       | 0,70 ml | 0,70 ml  |
| Lösung 2       | 0,05 ml | 0,05 ml  |

Die Proben wurden gemischt und 10 min bei 25°C im Wasserbad stehengelassen. Dann wurde

|          |         |         |
|----------|---------|---------|
| Lösung 3 | 1,75 ml | -       |
| Lösung 4 | -       | 1,75 ml |

zugegeben und gemischt. Die Lösungen wurden in 10 mm-Küvetten gegossen. Das Photometer wurde mit dem Leerwert bei 366 m $\mu$  auf die Extinktion 0,300 eingestellt, und die Extinktion der Probe gegen den Leerwert gemessen. ( $E_1$ ). Genau 10 Minuten nach der ersten Ablesung soll nach der Vorschrift von Boehringer der Leerwert auf 0,300 nachgestellt und die Extinktion der Probe gegen den Leerwert gemessen werden ( $E_2$ ). Die Extinktionsdifferenz  $\Delta E_{CPK}$  ergebe sich dann aus  $E_1 - E_2$ .

Zur graphischen Darstellung des Reaktionsablaufes wurden

die Extinktionen der Probe (P) und des Leerwertes (L) jede Minute gemessen, und  $\Delta E_{\text{CPK}}$  ergab sich aus der Differenz von  $(E_1 - E_{10})$  der Probe und  $(E_1 - E_{10})$  des Leerwertes; also

$$\Delta E_{\text{CPK}} = (PE_1 - PE_{10}) - (LE_1 - LE_{10}).$$

#### Berechnung

$$\Delta E_{\text{CPK}} \cdot 106 = \text{Millieinheiten (mU) im ml Extrakt}$$

#### Ergebnisse

Im ersten Versuch wurde die Testkombination an normalem Blutserum erprobt. Es wurde eine CPK-Aktivität von 0,424 mU/ml Serum gemessen, ein für normales Serum zu erwartendes Ergebnis. Dann wurden in einer Reihe von Versuchen unter den gleichen Bedingungen wie beim Blutserum Spermafleckenextrakte auf ihren Gehalt an CPK untersucht.

In keinem einzigen dieser Versuche konnten Enzymaktivitäten von annähernd 1 mU/ml nachgewiesen werden! Selbst bei Verwendung frischer Spermaflecken änderten sich die Ergebnisse nicht. Tabelle 2 zeigt den Reaktionsablauf eines solchen Versuches.

Tab. 2. Meßwerte der Bestimmung der CPK-Aktivität eines Spermafleckenextraktes

| Ext. | (Leerwert) | Ext. (Probe) |
|------|------------|--------------|
| 1.   | 0,300      | 0,286        |
| 2.   | 0,297      | 0,283        |
| 3.   | 0,294      | 0,280        |
| 4.   | 0,291      | 0,277        |
| 5.   | 0,288      | 0,274        |
| 6.   | 0,285      | 0,271        |
| 7.   | 0,282      | 0,268        |
| 8.   | 0,279      | 0,265        |
| 9.   | 0,276      | 0,262        |
| 10.  | 0,273      | 0,259        |

In diesem Falle ist  $\Delta E_{\text{CPK}} = 0$ , und somit ist die CPK-Aktivität ebenfalls gleich Null. In den anderen Versuchen wurden Enzymaktivitäten von 0,1 - 0,5 mU/ml gemessen.

Wegen der Labilität des DPNH in der Lösung 1 wurde seine Aktivität geprüft. Zu 3,00 ml bidest. Wasser wurden 0,05 ml der Lösung aus der Testkombination gegeben, und die Extinktion der DPNH-Lösung gegen Wasser gemessen; diese betrug 0,395. Die DPNH-Lösung war also intakt.

Gegen Fehler bei Ansatz oder Messung sprach die Tatsache, daß die Meßwerte sich in allen Versuchen annähernd gleichen und sich jederzeit reproduzieren ließen. Um jedoch methodische Fehler gänzlich auszuschließen, wurde in weiteren Versuchen CPK sofort nach der letzten Messung

der  $E_{10}$  von außen zugesetzt, und der weitere Reaktionsablauf verfolgt. Spuren des in Pulverform vorliegenden Enzyms (C.F. Boehringer) wurden zu diesem Zweck in 1 ml der Lösung 4 aus der Testkombination gelöst; jeweils 0,01 ml dieser Lösung wurde in die Küvetten gegeben. Es zeigte sich, daß die Reaktion in der Küvette mit der Probe zwar sofort in Gang kam, daß die Reaktion aber infolge Verbrauchs des DPNH durch die Meßvorgänge sehr schnell erschöpft war. Darum wurde im nächsten Versuch dem Bestimmungsansatz die doppelte Menge der Lösung 1 zugesetzt. Tabelle 3 und die Kurve demonstrieren sehr schön das Einsetzen und den Verlauf der Reaktion nach Zusatz des Enzyms.

Tab. 3. a = Extinktionswerte von der Messung der CPK-Aktivität eines Spermafleckenextraktes. b = Einsetzen der Reaktion in der Probe nach Zusatz des Enzyms zu beiden Lösungen.

| a. Ext. | (Leerwert) | Ext. (Probe) |
|---------|------------|--------------|
| 1.      | 0,300      | 0,315        |
| 2.      | 0,292      | 0,306        |
| 3.      | 0,289      | 0,302        |
| 4.      | 0,284      | 0,297        |
| 5.      | 0,279      | 0,293        |
| 6.      | 0,274      | 0,288        |
| 7.      | 0,269      | 0,283        |
| 8.      | 0,264      | 0,278        |
| 9.      | 0,259      | 0,273        |
| 10.     | 0,254      | 0,268        |

$$\Delta E_L = 0,046 \quad \Delta E_P = 0,047$$

$\Delta E_{CPK} = 0,001$ ; somit beträgt die Enzymaktivität 0,106 mU/ml.

b. Nach Zusatz von CPK

|     |       |       |
|-----|-------|-------|
| 11. | 0,250 | 0,250 |
| 12. | 0,245 | 0,220 |
| 13. | 0,240 | 0,175 |
| 14. | 0,235 | 0,085 |
| 15. | 0,230 | 0,050 |
| 16. | 0,225 | 0,046 |
| 17. | 0,220 | 0,043 |
| 18. | 0,215 | 0,043 |
| 19. | 0,210 | 0,043 |
| 20. | 0,205 | 0,043 |

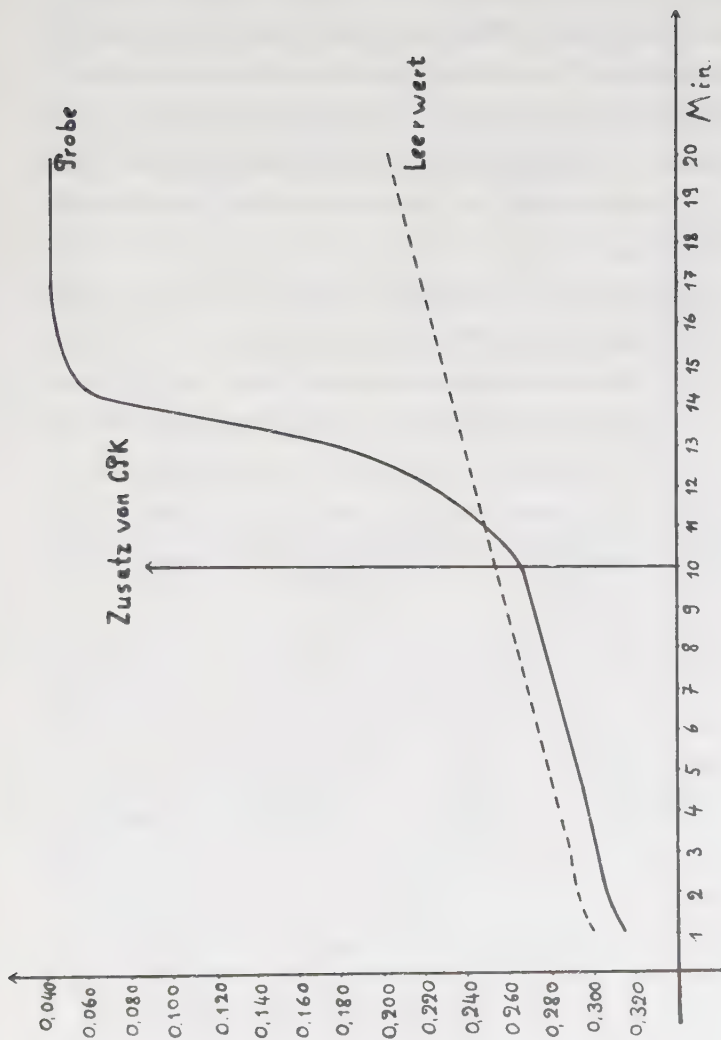


Abb. 6: Darstellung der Messwerte aus Tabelle 3

### 3. Besprechung

Die photometrische Messung wurde bewußt der kolorimetrischen vorgezogen, da die kolorimetrische Messung beim Nachweis von Enzymen und ihrer Aktivitätsbestimmung nicht die Voraussetzungen einer exakten und objektiven Beurteilung erfüllt. Dagegen liefert der optische Test nach WARBURG sehr exakte Ergebnisse. Er ist heute zur Bestimmung von Enzymaktivitäten die Methode der Wahl.

Nach GRIFFITHS und LEHMANN kann man in menschlichen Spermaflecken an Hand der durch kolorimetrische Messung erzielten Ergebnisse hohe Konzentrationen von CPK nachweisen - als durchschnittliche Enzymaktivität geben sie 2030 U/ml Fleckenextrakt an - während man nach den Ergebnissen der eigenen Versuche mittels photometrischer Messung das Vorhandensein von CPK im menschlichen Sperma verneinen muß.

In unseren Versuchen zeigte sich über eine Meßzeit von 10 min fast keine Extinktionsdifferenz zwischen Leerwert und Probe, was bei Vorhandensein von CPK in der Probe zu fordern wäre. Bei Enzymaktivitäten in der Höhe, wie sie von GRIFFITHS und LEHMANN angegeben wurden, müßte sich die Extinktion der Probe in kürzester Zeit auf einen Wert einstellen, der durch die vorhandene Menge an DPNH im Bestimmungsansatz vorbestimmt wäre, und der weit unter der Extinktion des Leerwertes liegen müßte. Die Reaktion in der Probe kam aber sofort in Gang, als sowohl zu dieser, als auch zum Leerwert Spuren des Enzyms von außen zugegeben wurden.

Damit stand fest, daß nicht methodische Fehler Ursache der negativen Ergebnisse waren.

Die unterschiedliche Arbeitsmethode allein dürfte jedoch nicht die Diskrepanz erklären, die sich bei der Nachprüfung der Ergebnisse von GRIFFITHS und LEHMANN ergab. GRIFFITHS und LEHMANN haben die Aktivität der CPK mit Kreatinphosphat als Substrat gemessen. Seit KUTSCHER und WOLBERGS ist es eine bekannte Tatsache, daß im menschlichen Sperma hohe Konzentrationen eines anderen Enzyms vorkommen, nämlich der saueren Phosphatase. Dieses Enzym stellt ein phosphat-abspaltendes Enzym dar, d.h., auf die Reaktionsgleichung von GRIFFITHS und LEHMANN bezogen, entfaltet es folgende Wirkung:



Da in der Gleichung von GRIFFITHS und LEHMANN freigesetztes Kreatin die Meßgröße für die Aktivität der CPK darstellt, besteht der Verdacht, daß die Autoren nicht die Aktivität der CPK, sondern die der saueren Phosphatase gemessen haben. Wollte man diesen Verdacht erhärten, so müßte man zunächst die saure Phosphatase aus den Spermafleckenextrakten zu eliminieren versuchen, und dann die Versuche von GRIFFITHS und LEHMANN wiederholen. Die Elimination der saueren Phosphatase ist jedoch sicherlich technisch sehr schwierig; deswegen wurde, nicht zuletzt auch wegen der eindeutigen Ergebnisse der eigenen Versuche, auf die weiteren Versuche verzichtet.

### E. Zusammenfassung

Zum Nachweis von Spermaflecken in Textilien wurden an 35 Spermaflecken die folgenden drei neueren Methodenangaben nachgearbeitet:

- 1) Papierchromatographische Methode nach LEVONEN
- 2) Präzipitinreaktion im Agar-Diffusionsversuch mit Hilfe eines Anti-Humansamenplasma-Serums (Behring-Werke, Marburg)
- 3) Nachweis von Kreatin-Phosphokinase.

Die papierchromatographische Methode nach LEVONEN wurde als cholin- und sperminspezifisch bestätigt; im übrigen zeigte sich individuell ein unterschiedlicher Gehalt an Spermin und Cholin.

Als kleinsten, noch identifizierbarer Spermaflecken wurden  $0,125 \text{ cm}^2$  ermittelt.

Bei Anwendung des Anti-Humansamenplasma-Serums der Behringwerke waren deutliche Präzipitate noch bei  $0,25 \text{ cm}^2$  großen Spermaflecken zu erkennen, jedoch zeigte das Antiserum Kreuzreaktionen mit Blutserum, Speichel und Vaginalsekret. Nach massiver Absorption des Antiserums mit den eingeengten Flüssigkeiten ließen sich jedoch spermaspezifische Reaktionen im Agar-Diffusionsversuch erzielen. Eine Absorption nur mit Blutserum führte jedoch nicht zum Ziel.

Die von englischen Autoren angegebene Methode zum Nachweis der behaupteten hohen Werte von CPK in Spermafleckenextrakten wurde photometrisch im zusammengesetzten optischen Test nachgeprüft. In keinem Falle

konnte eine Enzymaktivität von annähernd 1 mU/ml nachgewiesen werden. Vielmehr konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß infolge der von den englischen Autoren angewandten Technik in Wirklichkeit die Aktivität der saueren Phosphatase bestimmt wurde.

Literatur

- BAECCHI, B.: Über die Methode zur direkten Unterscheidung der Spermatozoen auf Zeugflecken. Vjschr. gerichtl. Med. 43, 1, 1912
- BASTERO BEGUIRISTAIN, J.: Die Bestimmung der Spermamenge in einem Fleck. Clin. y Labor 32, 116, 1941
- BERG, S.: Diaminoxydase bei Spurenuntersuchungen. Z. gerichtl. Med. 39, 89, 1948
- Methoden zum Nachweis von Genitalsekretspuren. Z. gerichtl. Med. 42, 605, 1954
- BOLTZ, W. und U. PLOBERGER: Der enzymatische Nachweis kleinster Mengen menschlichen Ejakulates in der forensischen Praxis. Arch. Kriminol. 117, 17, 1956
- BOHNE, G. und J. DIECKMANN: Zur Methodik der Identifizierung von Spermaflecken an Textilien. Z. gerichtl. Med. 44, 781, 1956
- CORIN, G. und E. STOCKIS: Arch. Antrop. crimin. 108, 180, Zit. nach von GÜTLINGEN
- CULLIFORD, B.: Präcipitin reactions in forensic problems. Nature 201, 1092, 1964
- DESPIEDS, R., J. RANQUE und A. MELLE FAURE: C. r. Acad. Sci. (Paris) 246, 189, 1958 Zit. nach MÜLLER und FONTAINE
- DERVIEUX, M.: C. r. Acad. Sci. (Paris) 172, 1384, 1921 Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)

- LLERMANN, V.:  
Vjschr. gerichtl. Med. 42, 116, 1911  
Zit. nach HEKTOEN und RUKSTINAT (1928)
- NNOR, A. und  
. ROSENBERG:  
Some Properties of Creatine Phospho-  
kinase. Biochem. J. 57, 203, 1954
- NNOR, A. und  
. STOCKEN:  
The Estimation of Creatine. Biochem.  
J. 42, 557, 1948
- ARNUM:  
Am. J. of the med. ass. 28, 12, 1901  
Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- INE, J.:  
Ann. Inst. Pasteur 93, 592, 1957  
Zit. nach MULLER und FONTAINE
- IORI, A.:  
Applicazione e limiti della reazione  
di FUCHS- TOKUOKA nella diagnosi  
medicolegale di macchie di sperma.  
Min medicoleg. 74 (1954)
- Ricerche spettrofotometriche sul  
complesso rame-spermina. Min medicoleg.  
75 (1955)
- Metodi cromatografici su carta nella  
diagnosi medico-legale di macchia di  
sperma. Min. medicoleg. 77 (1957)
- La reazione precipitante su vetrino di  
agar etc. Min medicoleg. 80, 73, 1960
- IORI, A. und  
I. MARIGO:  
Indagini comparative tra metodo in  
capillare e micrometodi in agar etc.  
Med. leg. 10, 67, 1962
- LORENCE:  
Du sperme et des taches des spermes en  
medicine légale. Arch. Antropol. criminol.  
21, 1897

- FUCHS, H.: Z. physiol. Chem. 257, 149, 1939  
Zit. nach FIORI (1954)
- GRABAR, P. und  
P. BURTON: Analyse Immuno-Electrophoretique.  
Applications aux liquides biologiques  
humains. Paris 1950
- GREVILLE, G. und  
H. LEHMANN: Unpublished observations (1942)  
Zit. nach GRIFFITHS und LEHMANN
- GRIFFITHS, P.: Thesis for M.D. (London). Zit. nach  
GRIFFITHS und LEHMANN
- GRIFFITHS, P. und  
H. LEHMANN: Estimation of Creatine Phosphokinase  
as an Additional Method for Identifi-  
cation of Seminal Stains. Med. Sci.  
Law 1, 32, 1964
- GÜTLINGEN, A. v.: Vergleichende Untersuchungen über die  
Brauchbarkeit von Spermanachweis-  
methoden an Flecken, besonders der  
papierchromatographischen Verfahren.  
Diss. Bonn 1961
- HANKIN, E.: Brit. M. J. 2, 1261, 1843, 1905. Zit.  
nach HEKTOEN und RUKSTINAT (1928)
- HEKTOEN, L.: J. Am. Med. Ass. 78, 704, 1922. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- HEKTOEN, L. und  
L. MANLY: J. Inf. Dis. 32, 157, 1923. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- HEKTOEN, L. und  
G. RUKSTINAT: Identification of Human Seminal Stains.  
Arch. Pathol. 6, 96, 1928
- HENLE, W.: J. of Immunol. 34, 325, 1938. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- HENLE, W., G. HENLE  
und L. CHAMBER: J. Exp. Med. 68, 335, 1938. Zit. nach  
LEITHOFF und LEITHOFF (1962)

- ERMANN, G.:  
Le plasma seminal in GRABAR und BURTIN  
Analyse Immuno-Electrophorétique.  
Paris 1960
- ERMANN, G., W. LICHT,  
. KEUTEL und E. KRUG:  
Naturwiss. 45, 268, 1958. Zit. nach  
LEITHOFF und LEITHOFF (1961)
- ERMANN, G., W. LICHT,  
. KEUTEL und E. KRUG:  
Z. ges. exp. Med. 130/5, 436, 1958.  
Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF (1961)
- UGHES, B.:  
A Method for the Estimation of Serum  
Creatine Kinase and its Use in Com-  
paring Creatine Kinase and Aldolase  
Activity in Normal and Pathological  
Sera. Clin. chim. Acta 7, 597, 1962
- AMINSKI, M.:  
J. Immunol. 75, 367, 1955. Zit. nach  
MULLER und FONTAINE
- ANDSTEINER, K. und  
. v.d. SCHEER:  
J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 25, 140  
1927. Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF  
(1962)
- AVES, W.:  
Hyaluronidase und Zeugungsfähigkeit. Z.  
gerichtl. Med. 39, 207, 1948
- LEITHOFF, H. und  
. LEITHOFF:  
Der Nachweis von Bluteiweißkörpern im  
menschlichen Samenplasma mit Hilfe der  
Immunoelktrophorese. Med. Welt 1961,  
1137
- LEITHOFF, H. und  
. LEITHOFF:  
Neue Ergebnisse immunoelktrophoreti-  
scher Untersuchungen des menschlichen Sa-  
menplasmas. Med. Welt 1962, 181
- LEITHOFF, H.:  
Neue Methoden der gerichtsmedizinischen  
Untersuchungen von Spermaflecken.  
Fortschr. Med. 1964, 493

- LEITHOFF, H. und  
U. GENKEL:  
Die Herkunft der organspezifischen  
Proteine des menschlichen Samenplasmas.  
Med. Welt 1964, 2073
- LEVONEN, E.:  
A Method for Identification of Seminal  
Stains by Paper Chromatography.  
J. Forens. Sci. 5, 102, 1960
- MANSI, W.:  
Slide Gel Diffusion Precipitin Test.  
Nature 181, 1289, 1958
- MARIQUE:  
Siehe STRASSMANN
- METCHNIKOFF, E.:  
Ann. Inst. Pasteur 14, 1, 1900. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- METALNIKOFF, E.:  
Ann. Inst. Pasteur 14, 577, 1900. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- MINET, J. und  
J. LECLERCQ:  
Ann. Hyg. publ. Mai 1911. Zit. nach  
LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- MISCHLER, T. und  
E. REINEKE:  
Immunological Identification of Human  
Seminal Stains. J. crim. Law 57, 1966
- MUDD, St.:  
J. Immunol. 13, 113, 1927. Zit. nach  
LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- MULLER, P. und  
G. FONTAINE:  
Identifizierung von biologischen Pro-  
dukten durch immunochemische Methoden.  
Z. gerichtl. Med. 49, 420, 1960
- OUCHTERLONY, Ö.:  
Antigen-Antibody Reactions in Gels. Acta  
Pathol. Scand. 26, 507, 1948
- PFEIFFER, H.:  
Wien. klin. Wschr. 18, 637, 1905. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- „Journ. Hyg.“ 48, 1911. Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)

- PÖLLAK, O.: Semen and Seminal Stains. Arch. Pathol. 35, 140 1943
- PURANEN, U.: Eine neue mikrochemische Methode zur Identifizierung von Sperma. Z. gerichtl. Med. 26, 366, 1936
- ROSS, V.: J. Immunol 52, 87, 1946. Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966
- STRASSMANN, G.: Grundriss der gerichtlichen und versicherungsrechtlichen Medizin. Berlin (Seemann) 1935
- TANZER, M. und C. GILVARG: Creatine and Creatine Kinase Measurement. J. biol. Chem 234, 3201, 1959
- THOMA, K., M. KOLL und K. FISCHER: Der papierchromatographische Nachweis von Spermin aus menschlichen Samenspiuren. Arch. Kriminol. 124, 100, 1959
- TOKUOKA, S.: Acta Scholae Med. Univ. Kioto. 27, 241, 1950. Zit. nach Fiori (1954)
- Acta Scholae Med. Univ. Kioto. 29, 15, 1951. Zit. nach Fiori (1954)
- UHLENHUTH, P.: Dtsch. med. Wschr. 27, 499, 1901. Zit. nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)
- Über die Entwicklung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens im Dienste der gerichtlichen Medizin unter besonderer Berücksichtigung eigener Forschungsergebnisse. Z. gerichtl. Med. 39, 309, 1948/49

UHLENHUTH, P. und  
K. WURM:

Z. Immun. Forsch. 96, 183, 1939, Zit.  
nach LEITHOFF und LEITHOFF (1962)

WEIL, A.:

Science 131, 1040, 1960. Zit. nach  
LEITHOFF und LEITHOFF (1962)

WEIL, A. und  
A. FINKLER:

Antigens of Rabbit Semen. Proceed. Soc.  
Exper. Biol. Med. 98, 794, 1958

Isoantigenicity of Rabbit Semen. Proceed.  
Soc. Exper. Biol. Med. 102, 624, 1959

WEIL, A., O. KOTSEVALOV  
und L. WILSON:

Antigens of Human Seminal Plasma. Proceed  
Soc. Exper. Biol. Med. 92, 606, 1956

WEIL, A., L. WILSON  
und A. FINKLER:

Immunological Test for Semen on Female  
Genitalia as Evidence of Intercourse.  
J. Forens. Sci. 4, 372, 1959

WINDSOR, F.:

Brit. med. J. 2, 501, 1908. Zit. nach  
HEKTOEN und RUKSTINAT (1928)

YAKULIS, V. und  
P. HELLER:

Rapid Slide Technic for Double Diffusion  
Agar Precipitin Test. Ann. J. clin.  
Pathol. 31, 323, 1959

Herrn Professor Dr. Schleyer danke ich für die  
Überlassung des Themas und seine Beratung bei den  
Versuchen und der Ausarbeitung der Dissertation.

### Lebenslauf

Am 6.2.1941 wurde ich als Sohn des Landwirtes Josef Klümpen und seiner Ehefrau Adele, geb. Vohwinkel, in Hartefeld Krs. Geldern geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Grundschule in Hartefeld. Anschließend war ich von 1951 an Schüler des Friedrich-Spee-Gymnasiums in Geldern, wo ich am 26.2.1960 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1960 begann ich mein Medizinstudium an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg. Dort bestand ich am 18.4.1961 die naturwissenschaftliche und am 9.4.1963 die ärztliche Vorprüfung. Mein klinisches Studium begann ich im Sommersemester 1963 an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf. Vom Sommersemester 1964 an setzte ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg fort, an der ich bis zum Ende des Studiums, mit dem Abschluß des medizinischen Staatsexamens, blieb.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren  
und Dozenten:

in Freiburg:

Bopp, Brauer, Fischer, Fleckenstein, Goerttler, Holzer,  
Keller, Koehler, Lüdtke, Lüttringhaus, Puff, Rose,  
Staubesand

in Düsseldorf:

Derra, Elert, Gillmann, Greef, Grewe, Große-Brockhoff,  
Idelberger, Kaiser, Kikuth, Meesen, Müller, Panse,  
Pothmann, Schlipköter

in Marburg:

Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Buchholz, Dölle, Gedigk,  
Hamm, Heuser, Jacob, Knauff, Lang, Linneweh, Mann,  
Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Petzold.  
Rohen, Salfeld, Sauer, Schleyer, Schrappe, Schwaiger,  
Siess, Straub, Streicher





